

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/33937 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. August 1998 (06.08.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/00382 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Februar 1998 (02.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 03 925.1 3. Februar 1997 (03.02.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOEHE, Margret [DE/DE]; Bartningallee 7, D-10557 Berlin (DE). WENDEL, Birgit [DE/DE]; Feuerbachstrasse 53, D-12163 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: GENOMIC SEQUENCE OF THE HUMAN μ -OPIOID RECEPTOR GENE AND THE VARIANTS, POLYMORPHISMS AND MUTATIONS THEREOF (54) Bezeichnung: GENOMISCHE SEQUENZ DES HUMANEN μ -OPIOID-REZEPTOR GENES SOWIE SEINER VARIANTEN, POLYMORPHISMEN UND MUTATIONEN (57) Abstract The invention relates to the genomic sequence of the human μ -opioid receptor gene and the variants, polymorphisms and mutations thereof. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie seiner Varianten, Polymorphismen und Mutationen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie seiner Varianten, Polymorphismen und Mutationen

Die Erfindung betrifft die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie seiner Varianten, Polymorphismen und Mutationen und deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß der menschliche μ -Opioid-Rezeptor Schmerzempfindung, 'Reward'-mechanismen sowie weitere wichtige physiologische Funktionen kontrolliert. Er ist der hochspezifische Angriffspunkt für Morphin, das klassische Schmerzmittel der modernen Medizin. Darüber hinaus ist er Angriffspunkt weiterer medizinisch bedeutsamer Analgetika, Anästhetika und Therapeutika wie z. B. Methadon und Fentanyl sowie weitverbreiteter Suchtstoffe wie z.B. Heroin und Methadon. Aufgrund einer Reihe von (patho)physiologischen, biochemischen, pharmakologischen Befunden, knockout-Befunden am Tiermodell, und genetischen Studien ist davon auszugehen, daß das μ -Opioid-Rezeptor Gen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Analgesie und Anästhesie sowie bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Suchterkrankungen (Opiatabhängigkeit, Alkoholismus und andere Formen der Abhängigkeit) spielt, und daß Varianten in den regulierenden, kodierenden und intronischen Regionen dieses Genes mit zum genetischen Risiko für Suchterkrankungen beitragen. Darüber hinaus könnten solche Varianten die Ansprechbarkeit dieses Rezeptors auf endogene und exogene Rezeptorliganden

entscheidend mit beeinflussen.

Suchterkrankungen sind Volkskrankheiten von internationaler Dimension, und im allgemeinen mit kaum überschaubaren, gravierenden volkswirtschaftlichen Schäden in Milliarden- bis Billionenhöhe verbunden, ganz zu schweigen von den deletären psychosozialen Konsequenzen für den einzelnen Menschen, seine Familie und die Gesellschaft.

Die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes ist nicht bekannt. Beschrieben wurde bisher lediglich die cDNA von μ -Opioid-Rezeptoren; die erste cDNA eines μ -Opioid-Rezeptors wurde von Chen et al. (Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. Mol. Pharmacol. 44, 8-12, 1993) mittels Proben gegen konservierte Bereiche des δ -Opioid-Rezeptors aus einer cDNA-Genbank der Ratte kloniert, die erste menschliche MOR-cDNA von Wang et al. (Mu-opiate receptor: cDNA cloning and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 10230-10234, 1993). Die bisher einzig bekannte Promotersequenz wurde aus einer Mäuse-Genbank kloniert (Min et al., Genomic structure and analysis of promoter sequence of a mouse μ opioid receptor gene Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 9081-9085, 1994).

Aktuelle Befunde an 'knockout'-Mäusen mit unterbrochenem μ -Opioid-Rezeptor Gen zeigen klar, daß die analgetischen wie 'Reward'-induzierenden und abhängigkeiterzeugenden Wirkungen von Morphin spezifisch über den μ -Opioid-Rezeptorsubtyp, nicht jedoch über δ - und κ -Opioid-Rezeptorsubtypen vermittelt werden. Demnach ist der μ -Opioid-Rezeptor die obligatorische molekulare Bindungsstelle für Morphin in vivo (Matthes et al., Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. Nature 383, 819-823, 1996). Unabhängig davon haben pharmakologische

und andere Untersuchungen gezeigt, daß der im Gehirn exprimierte μ -Opioid-Rezeptor für die Entwicklung von Toleranz, Sucht und Analgesie von entscheidender Bedeutung ist (Reisine, Neurotransmitter Receptors V. Neuropharmacology 34, 463-472, 1995). Als endogene Liganden kommen dabei die Endorphine in Betracht. Exogene μ -Opioid-Rezeptorliganden wie Morphin, Codein, Methadon und Fentanyl werden seit langem klinisch als Analgetika und Therapeutika eingesetzt.

Die klinische Anwendung von Opiaten führt bekanntermaßen zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Atmungsstörungen, Miosis, Nausea und Vomitus, Sedation, Depressionen und Abhängigkeit.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptors zu bestimmen und bereitzustellen, die als Ausgangsbasis zur Entwicklung von spezifischen und wirkungsvollen Analgetika, Anästhetika sowie Sucht-Therapeutika verwendet wird, insbesondere zur Entwicklung von z.B. Analgetika ohne suchterzeugende Wirkung oder zur Entwicklung diagnostischer Kits.

Erfindungsgemäß konnte die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie von Varianten, Polymorphismen und Mutanten in spezifischen Populationen ermittelt und bereitgestellt werden.

Die erfindungsgemäß amplifizierte und sequenzierte genomische DNA-Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptors besteht aus

1) einem Promoterbereich (inkl. 5'-regulatorischer Bereich) SEQ ID No. 1 mit einer Länge von insgesamt 2412 bp.

Die Herstellung des Promoters erfolgt nach an sich bekannten Verfahren durch Amplifikation der fünf verschiedenen genomischen DNA-Bereiche, die den humanen μ -Opioid-Rezeptor

Promoterbereich abdecken.

2) Dem Intron 2, dessen genomische DNA-Sequenz sich zwischen den Nukleotiden 855 und 856 der cDNA-Sequenz (bzw. zwischen den Nukleotiden 643 und 644 relativ zum A des Translationsstartpunktes) mit einer Länge von 773 bp befindet gemäß SEQ ID No. 2.

3) Der 5'-Region des Introns 1, deren genomische DNA-Sequenz sich nach dem Nukleotid 502 der cDNA-Sequenz (bzw. nach dem Nukleotid 290 relativ zum Translationsstartpunkt) mit einer Länge von 383 bp befindet gemäß SEQ ID No. 3; und der 3'-Region, deren genomische DNA-Sequenz vor dem Nukleotid 503 der cDNA-Sequenz (bzw. vor dem Nukleotid 291 relativ zum Translationsstartpunkt) mit einer Länge von 538 bp befindet gemäß SEQ ID No. 4.

4) Der 5'-Region des Introns 3, deren genomische DNA-Sequenz sich nach dem Nukleotid 1376 der cDNA-Sequenz (bzw. nach dem Nukleotid 1164 relativ zum Translationsstartpunkt) mit einer Länge von 300 bp befindet gemäß SEQ ID No. 5; und der 3'-Region, deren genomische DNA-Sequenz sich vor dem Nukleotid 1377 der cDNA-Sequenz (bzw. vor dem Nukleotid 1165 relativ zum Translationsstartpunkt) mit einer Länge von 400 bp befindet gemäß SEQ ID No. 6.

Die Sequenzierung der Introns erfolgt analog der Promotersequenzierung.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die bereits bekannte menschliche cDNA-Sequenz, die aus 2162 bp besteht, in den ersten 16 Nukleotiden fehlerhaft ist, die cDNA hat erfindungsgemäß die SEQ ID No. 7.

Die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes ist

in den Abbildungen 1a und 1b in einer Übersicht dargestellt.

Es wurden vier verschiedene Transkriptionsstartstellen an den Positionen 212, 329, 371 und 421 bp vor dem Translationsstart (ATG) identifiziert.

Varianten, Polymorphismen und Mutanten in spezifischen Populationen sind durch Basenaustausche gekennzeichnet. Erfindungsgemäß sind es Basenaustausche an bis zu 100 Nukleotidpositionen, vorzugsweise werden bis zu 37 Basenaustausche durchgeführt. Besonders bevorzugt erfolgen in der cDNA-Region bis zu 20, ganz besonders bevorzugt bis zu 11 Basenaustausche.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform finden Basenaustausche an den folgenden Stellen des Promoters (= RG = 5' Regulatorische Region), der Exons (= cDNA-Sequenz) und der Introns statt:

Name	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch/ Splice-Variante	Region	cDNA Position
-1793/4T→A	T→A bei -1793/4		RG	
-1768ins22	Insertion von 22 bp nach -1768		RG	
-1699insT	Insertion von T nach -1699		RG	
-1595T→C	T→C bei -1595		RG	
-1565T→C	T→C bei -1565		RG	
-1469T→C	T→C bei -1469		RG	
-1320A→G	A→G bei -1320		RG	
-1255A→T	A→T bei -1255		RG	
-1236A→G	A→G bei -1236		RG	
-1171A→G	A→G bei -1171		RG	
-1045A→G	A→G bei -1045		RG	
-995C→A	C→A bei -995		RG	
-692G→C	G→C bei -692		RG	
-665del3	Deletion von 3 bp von -665 bis -663		RG	
-554G→A	G→A bei -554		RG	
-488G→T	G→T bei -488		RG	
-254A→C	A→C bei -254		RG	
-236A→G	A→G bei -236		RG	

-172G→T	G→T bei -172		Exon 1	41
-133C→T	C→T bei -133		Exon 1	80
-111C→T	C→T bei -111		Exon 1	102
-38C→A	C→A bei -38		Exon 1	175
A6V(C→T)	C→T bei 17	Ala→Val bei 6	Exon 1	229
N40D(A→G)	A→G bei 118	Asn→Asp bei 40	Exon 1	330
N152D(A→G)	A→G bei 454	Asn→Asp bei 152	Exon 2	666
IVS2+31G→A	G→A bei 643 + 31	Putative Splice-Variante	Intron 2	
IVS2+106T→C	T→C bei 643 + 106		Intron 2	
IVS2+397T→A	T→A bei 643 + 397		Intron 2	
IVS2+438G→A	G→A bei 643 + 438		Intron 2	
IVS2+480T→C	T→C bei 643 + 480		Intron 2	
IVS2+534C→T	C→T bei 643 + 534		Intron 2	
IVS2+691G→C	G→C bei 643 + 691		Intron 2	
R265H(G→A)	G→A bei 794	Arg→His bei 265	Exon 3	1006
S268P(T→C)	T→C bei 802	Ser→Pro bei 268	Exon 3	1014
T314T(G→A)	G→A bei 942	Thr=Thr bei 314	Exon 3	1154
IVS3+37A→C	A→C bei 1164 + 37		Intron 3	
1401G→C	G→C bei 1401		Exon 4	1613

Dieser Austausch kann wahlweise nur an einer der oben genannten Nukleotidpositionen, an beliebigen der genannten Positionen oder an allen genannten Positionen erfolgen.

Solche interindividuellen Allelvariationen in den kodierenden und regulierenden DNA-Bereichen von humanen μ -Opioid-Rezeptoren gehen gemäß der Erfindung mit individuell unterschiedlicher Ansprechbarkeit auf Anästhetika/Therapeutika und Suchtstoffe, sowie einem erhöhten genetischen Risiko für Abhängigkeit oder z.B. physiologisch veränderter Schmerzempfindlichkeit einher. Sie werden somit als Ausgangspunkt für die Entwicklung individuell maßgeschneiderter Therapeutika, die Prädiktion individueller Therapie'response' sowie des genetischen Risikos für Sucht eingesetzt und tragen damit zugleich zur Prävention bei. Darüber hinaus sind sie Ausgangspunkt für die Genotypisierung von Individuen, um langfristig relevante Umweltfaktoren untersuchen zu können.

So dienen die Sequenzen gemäß der Erfindung zur Entwicklung von Therapeutika, insbesondere von Analgetika/Anästhetika und Drogen-Therapeutika. Sie werden zum Aufbau von Genen und Vektoren eingesetzt, die die Basis für die Entwicklung dieser pharmazeutisch relevanten Substanzen darstellen.

Es werden außerdem diagnostische Testkits zur Vorhersage des Suchtrisikos, wie z.B. Opiatabhängigkeit, Alkoholismus, Kokainabhängigkeit und weitere oder zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene Analgetika und/oder Anaesthetika sowie zur individuell unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen bereitgestellt.

Bei der weiteren Ausgestaltung der Erfindung wurde gefunden, daß Korrelationen gefundener Varianten im μ -Opioid-Rezeptor Gen mit Erkrankungen bzw. klinisch relevanten Phänotypen auftreten.

Eine signifikante Assoziation/ spezifischer Zusammenhang der Asn->Asp Mutation an Position 40 der Aminosäuresequenz (Position 330 der cDNA Sequenz) mit familiär bedingtem Alkoholismus wurde nachgewiesen. Diese Sequenzposition steht nicht nur mit Alkoholismus als spezifischer Suchtform, sondern auch mit einer generellen Suchtdisposition, wie sie beim Menschen durch die nahezu übliche, sehr häufige klinische Form der Polytoxikomanie (hier durch den gleichzeitigen Abusus von Alkohol, Opiaten, und Kokain) zum Ausdruck kommt, in Zusammenhang. Darüber hinaus bedingt diese Mutation einen funktionellen Zustand des menschlichen μ -Opiat-Rezeptors, der eine veränderte Ansprechbarkeit des Rezeptors auf Liganden (endogene und exogene Liganden einschließlich Therapeutika, Anaesthetika, und Drogen) zur Folge hat, sowie eine veränderte Ansprechbarkeit des Rezeptors auf prolongierte bzw. wiederholte Applikation dieser Liganden, und damit eine Bedeutung für die Entwicklung von Toleranz (Desensitivierung des Rezeptors auf chronische Medikamentenverabreichung) und Abhängigkeit.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß spezifische Kombinationen von Varianten im 5' regulatorischen Bereich mit einer Disposition für verschiedene Erkrankungen, insbesondere Suchterkrankungen, in Zusammenhang stehen. Insbesondere die Positionen -1793/4T->A, -1768ins22, -1699insT, -1469T->C, und -1320A->G sind in dieser Hinsicht von Bedeutung. Speziell ist die Kombination -1793/4A, -1768 Wildtyp, -1699insT, -1469T und -1320G mit einer Disposition für Kokainsucht, und mit einer Suchtdisposition im allgemeinen (einschließlich Alkoholismus und Opiatabhängigkeit) verknüpft, und geht funktionell mit einer veränderten Expression des Rezeptors einher. Diese beschriebene Kombination ('Haplotyp') kann den realen, gesamten Funktionszustand des Rezeptors in der pathophysiologischen Situation besser beschreiben als eine einzelne assoziierte Variante. Dieser Analyse liegt das Konzept zugrunde, daß es nicht ausschließlich einzelne Mutationen sind, die

unterschiedlichen funktionellen (dysfunktionalen) Rezeptorzuständen zugrunde liegen, sondern diese auch durch die individuelle 'polymorphe' Gesamtgenesequenz als funktionsdeterminierender Einheit bedingt werden.

Gegenstand der Erfindung ist danach ein Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die DNA eines Probanden isoliert und an den ausgewählten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die Positionen -1793/4T->A, -1768ins22, -1699insT, -1469T->C und -1320A->G genotypisiert werden.

Es genügt zum Nachweis der Suchtdisposition, wenn 3 dieser 5 Positionen untersucht werden, bevorzugt und mit sicherem Aussagewert ist jedoch, alle 5 Positionen zu genotypisieren. Zusätzlich ist die Untersuchung der Position 330 der cDNA-Sequenz in Zusammenhang mit einer Alkoholdisposition im Testverfahren möglich.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren wie z. B. allelspezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden sowie Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich u. a. eine Disposition für familiär bedingten Alkoholismus, für Kokainsucht und für eine Opiatabhängigkeit bestimmen. Weiterhin kann auch eine individuell unterschiedliche Reaktivität auf Rezeptoragonisten und -antagonisten erfaßt werden.

Promoter 2412 bp SEO ID No. 1

TGTGTTAGTGAGCAGACCTCCCTTAGGAACCTTATTACGGAGTACAAAGCTAGGAGAGTAAAT
AAAGTATATTAAAAAATGCATACAAAAGATGACAGAATCACCATTCCAAAAGATCTTGGTGGA
TAAGAATCATGAATTGGATCTAACAAGATGTAACCTAAAAGTGAAAAAATCTATAGTGTGTGTA
CTGAGCTCCCTCCAAAGCAACTATAAATTTATAGGAGATGAAACATATGATTCCACCAGGCATA
AGAAGAAAGTTTCCGTAATCAAACACTATTGTATCCATCTTTTAAACTCCAGCTCCTATCAC
AGCACCTGGTCCAAAGCAGATCTTTAGTATTTGTGGAACCTGGCTTGGATTGTGTTTAGGAAAT
TTTGTCAATTGGTAAACCTAAGGAGAGTCAAGAGAACAACGTGACCAAAAAATAAACTAAAA
AAAAAAAAGGGACTTTTCATTGTACTGGTAGAAAGACAAAGTTTATAATCTGGCTTAGTTTCT
TTTTTTGTGTTGTTGTTTGTGTTTGGTTCAGGGCAAATTTAGGTCATTATTTTAACTGGAAC
TGTAGTTTCAGAGCAGATAGACAACTATCAATGAGAATAGATGAACAGCAAGGCCACTGAAA
GGACTCAGAACTACATCTTATAAGAAACAACTGAATGATGCTAATGTTTAACTTGCAAAAGAG
AAACTCAGTTGATTTCAAATATATGAAATATAGTGGTAAGGAGTTATCACTTATTAAGCAAT
TACTATTGCAATGTATACTCATTTAATCCTGCTAACAGACATATGAGGTGAATATTATTAGCC
TACCCTCGCCTTTTTTAAGTAATGAGAAGACTGTCTCCTGTAGGGTAAAGTAACATGTCCAA
ACTCATAACAGCTACAAAGTTACAAAGCTGATTTATAAAATGATTGACTCCAAGGTCAGGAATT
ATTATACTGTGTCTTGTCTTCCACATGAACTAAGCACAAAGGAACTGAATGCAGGCAGACAGA
TTTCAGCTCAATATAAGAGAATTGTTACATTAGTTCATGGAAGAATATGTTTTAAGGTATTTT
TGTTAGTCTCTAGGAAATCTCTGTAACATTTTATTGTGTAAATTATATGCTTTAATGTAAGAG
GATAAAAATAATAGTGAACATTGGCAAAATAGCCTATGATTAATAGAGTTTACCTATGAGTTA
TCTGTTTCTAAGATAAATGCCAAAAAATAATATTGGAATTAAATGTTTCTTTCAAGATCTTCC
CTCCCTGCTCCCTGAAATTGCAGTGAATTTTTCAAGACCAACTGAGGACATGTATTTTCAATG
TTTATGGTTAAAAGATATGTACATGCACAGATATATACATGTACAGAAATGAGAATTACTTCA
GAATTGGTGTAACTTTAGAAAAAAAAGACCAAGAACTTACTCTTGGTATTTACAAATTTAT
TTCTAAAATAGAAGCACTCATGGACTTAGAAGTAAGGTATAAAATTCAAAAACGTATCCATGT
TTCTCAAGGATCTTGTGTTAGGCCACTCTAATTCCATATATTATGTGGCTTTTCCTAGAATTT
TTACACTAGAAAACAGACTGAATGCAAAATTTGTTTTGTTTTAACCAACCTTCTTCTCAGAAGC
ATATGTCTATCGAGGAAGTCTTCAGATAAAAAAGATAAACAAATCCAAACAGGTCTATGAGAT
TTAAGATGTGAAAGATCAACATTATCTTTAGTTGACTTTACTGGATGCCACAACCTTCTGATT
TCTGTAACCACTTCTTATGCCTCCTACCCACTGAAACAAAATCAGAGGCAACAGAGCTTCAC
CCTAGAAATTGGGGAAAATGAGGAACAGGTTTTCTGCACAAAAGTTTATTTGTTTCTCATTTT
TTTTTCAGAAAATAAAGGATCGCTGTTGTTCCCAACAGGTTTGTAGGGAAGAAAATTGGAGAA
ACATTATTACCTTTTCTTAGATGTTGGCAACGGAGGCAACAAGGACTGCAAAAGAAAATTGTG

TGTCCCCCATTCCTAAATAATCAAAATTGGCAGTAGGGATGGAAGAGCATTTGGGGTTTTAGGG
CTGTTAGGGTTTTATCAAGCCAATGTATTCCCTGCCAGATTTTAAGGAGAAAAAGGCGCTGGA
AAATTGAGTGATGTTAGCCCCCTTTCTTATTTTTGCACTGCTACCAAAGACTAACTCTATCTC
TCTCCCCAACCCTTCTCTCCATCTCCCTCCTTTAGATGTGTTTGCACAGAAGAGTGCCCAGTG
AAGAGACCTACTCCTTGGATCGCTTTGCGCAAAATCCACCCCTTTTCCCTCCTCCCTCCCTTC
CAGCCTCCGAATCCCGCATGGCCACGCTCCCTCCTGCAGCGGTGCGGGGCAGGTGATGAGC
CTCTGTGAAC TACTAAGG

2412

SEQ ID No. 2 - Intron 2

GTGAGTGATGTTACCAGCCTGAGGGAAGGAGGGTTCACAGCCTGATATGTTGGTGATGTCATA
AGCAAAGCAGTATTTATGGAGTGCCCCATTGTCTTAGTCACATTGTAATTTTAATTATTCTTC
CTAGCAAAAAAGCCTTTGAATACTTAAAAATAGGAATTTTCCTCATAATTTTAGGCCTATTA
AATCCTTTAAAGAGAATGTAATCTATTTATTTCTGATTTCTCTGTATTTACTTCATAAAAAATG
GTGTGTAAATTAGTACATAGCTCTCCCAAGAGTAATTGGAGCTTAAACCCAAAGAGTATTACA
CTGAGGCTTGTTTAAATTTATCAAGTGGCTGACTACATGGCAAATGTATCTTTCTACACCTAA
TATCAGAATATTGAACAATCCATCAAAAAATGAAGTGAAACATCCATTACCTGGAGCCGCCT
AGAGACTTTGGACAATTATTACATTTTTTATATCAATATAGACCTCATGGAGGATCTAGCTCA
TGTTGAGAGGTTCAATTTTTGTTCCCTGAACGAAAGCTTAATGTGATCGAAGTGGACTGCAAAA
TGGGAAATTTAGAAAAAAACAAAAACATTAGAAGTAAACCTTTCTTTGAAAAGTAACAAACA
ACTGAGTTTCTTCCACAATTTCTTTATAGCCTTAAGTTAGCTCTGGTCAAGGCTAAAAATGAA
TGAGCAAAATGGCAGTATTAACACCTTATGACATAATTAATGTTGCTGCTAATTTTTCTCTT
AAATTCCTTTCTTCTAG

773

SEQ ID No. 3 - Intron 1 5'-Region

GTAAGGAAAGCGCCAGGGCTCCGAGCGGAGGGTTCAGCGGCTTAAGGGGGTACAAAGAGACAC
CTAACTCCCAAGGCTCAATGTTGGGCGGGAGGATGAAAGAGGGGAGGTAAACTGGGGGGACTC
TGGAGGAGACCACGGACAGTGATTGTTATTTCTATGAGAAAACCTACTTTTCTGTTTTTTCTT

CAACTGATAAAGAAAGAATTCAAAATTTTCAGGAGCAGAGAAGTTGCTTTGGTAAAAGCTACAA
ATGTCTAGGGGTGGGGGGCGGAGGGAAGCTATAGCATAGACTTGGAGCGCTTCCTTATACTGA
GCAAAGAGGGCTCTTGGCAGAGTCCTACACTCAGTCCCTCTGCAGGAGCTATGGAAAGAGTAA
GTTGT

383

SEO ID No. 4 - Intron 1 3'-Region

AAAAAAAAAATTAAAACCCCTCACTGCGTGTGGTGTCTCATGCCTGTAACACAAACACTTTGGG
AGGCCGAGGAGGGAGGACTGCTTGAGCCCAAGAGTTCAAGACCACCCTAAGCAACATGTCAAG
ACCCTGTCCCTACAAAAGTTTTTTAAAATTAACAGGGTATGGTGGCATGCACCTGGGATCCCA
GTTATTCAGGAGGTGAGGCAAGAGGATCTCTTGAGTCCAGGAGGTTAAAGCTGTAGTGAGCTC
TGTTCATACCATTACACTCCAGCCTGGGTAACAGGGCAAGATCCTATCCAAAAAAAAAAGGA
AGAACTCAACAAAGCAGCATCGTTGCTATTATTGCAGCTATTTAGCCAATAGGTACATCATT
GACATCATTTGTAAATAGCCAAGCTGATACTGGAAAACAATTCTATATCTAATCTCAAAAAGC
TTTCTACTAATTTTCATGCAAATTTATTATTGGAAGCTTACCTATATTTTACACTAGTGTCTTT
TACTGATTCTCACTCTTCTTCCTTTATCTCCTAG

538

SEO ID No. 5 - Intron 3 5'-Region

GTACGCAGTCTCTAGAATTAGGTATATCTACTGGGGATGACATAAAAATTATAAGGCTTTGTG
CTAACTAGGAGTTTAATCCATTATAGAGGATGAGAATGGAGGGAAGAGGGGAAGCAAATGTG
GGTTCAGTGTAGAGAAGAGGTTTGTATATAAACTGTGTTCTTTATATTTGACTGTACATA
TTCATTTAGGTATAAAGATACACCAATGAGAAATCCATGAACTATTCAAAATAACTATTTTTT
ATGGCCTTTACTTCTATGCAAAAATTTTATGACTTTAGCACATTATAG

300

SEO ID No. 6 - Intron 3 3'-Region

TGGTACTGAAAAAACATCGTTTTTCTTTCAAATTTTGATCAAGTCATAAATGATTTGAGGC
TAAAGAGGGAGGAAGAGGGTAAAAAAGGGGGAGAAAGAGTTTCAATTAAATGTATTTTTTC
AAGGAAATTATCAATAATCTCTCTATAATGACTAGTATACAGTTCTTTTCAGTAGCATACACA
AATGAAGAGCATATTCATAATGAGCCAGAAGATTATTCATAATGTCTGAAGAGATTGATTAAT

GTCTTGACATTTAAGAAAACTGAGGCTTGCAGGTGAAAGTATACATGAAGGTCTTCAATGCA
GTTCTTACGAGCAGAGATGCTCAACAAATGTGTGTTGCAACCGTATCTGAAATGTTCACTGTC
TTTGCTCTTTCTCTCCTTTTCAG 400

SEQ ID No. 7 - cDNA

tgggagggggctatacgagaggagaatgtcagatgctcagctcgggtcccctccgcctgacgc
tcctctctgtctcagccaggactggtttctgtaagaaacagcaggagctgtggcagcggcgaa
aggaagcggctgaggcgcttggaacccgaaaagtctcgggtgctcctgggtacctcgacacagcg
gtgcccgcggcggtcagtagctgacagcagcgctgccccacgaacgccagcaattgca
ctgatgccttggtactcaagttgctccccagcaccagccccgggttcctgggtcaacttgt
cccacttagatggcaacctgtccgacctatgcggtccgaaccgcaccaacctgggcgggagag
acagcctgtgccctccgaccggcagtcctccatgatcacggccatcacgatcatggccctct
actccatcgtgtgctgggtggggtctcttcggaaacttcttggtcatgtatgtgattgtcagat
acaccaagatgaagactgccaccaacatctacattttcaaccttgctctggcagatgccttag
ccaccagtaccctgcccttcagagtgtgaattacctaattgggaacatggccatttggaacca
tcctttgcaagatagtgtatctccatagattactataacatgttcaccagcatattcaccctct
gcaccatgagtgttgatcgatacttgagctctgccaccctgtcaaggccttagatttcgta
ctccccgaaatgccaaaattatcaatgtctgcaactggatcctctcttcagccattgggtcttc
ctgtaatgttcattggttacaacaaaatacaggcaaggttccatagattgtactaactaattct
ctcatccaacctgggtactgggaaaacctcgtgaagatctgtgttttcatcttcgccttcatta
tgccagtgtcatcattaccgtgtgctatggactgatgatcttgcgctcaagagtgtccgca
tgctctctggctccaaagaaaaggacaggaatcttcgaaggatcaccaggatgggtgctgggtg
tggtgggtgtgttcacgtctgctggactcccattcacatttacgtcatcattaaagccttg
ttacaatcccagaaactacgttccagactgtttcttggcacttctgcattgctctaggttaca
caaacagctgcctcaaccagtcctttatgcatttctggatgaaaacttcaaacgatgcttca
gagagttctgtatcccaacctcttccaacattgagcaacaaaactccactcgaattcgtcaga
acactagagaccacctccacggccaatacagtggtatagaactaatcatcagctagaaaatc
tggaagcagaaactgctccgttgccctaacagggtctcatgccattccgaccttcaccaagct
tagaagccaccatgtatgtggaagcaggttgcttcaagaatgtgtaggaggctctaattctct
aggaaagtgcctacttttaggtcatccaacctcttctctcttgccactctgctctgcacat
tagagggacagccaaaagtaagtggagcatttggaaggaaaggaatataccacaccgaggagt
ccagtttgtgcaagacaccagtggaacaaaacccatcgtgggtatgtgaattgaagtcata
taaaagggtgacccttctgtctgtaagattttattttcaagcaaatatttatgacctcaacaaa

gaagaaccatcttttggttaagttcaccgtagtaaacacataaagtaaagctacctctgatcaa
agcaccttgaatggaaggtccgagtcttttttagtggttttgcaagggaatgaatccattattc
tattttagacttttaacttcaacttaaaattagcatctggctaaggcatcattttcacctcca
tttcttggttttgattgttttaaaaaaataacatctctttcatctagctccataattgcaag
ggaagagattagcatgaaaggtaatctgaaacacagtcacgtgtgtcanctgtagaaaggttgat
tctcatgcactncaaatacttccaaagagtcacatcatgggggatttttcattcttaggctttca
gtggtttgttccttgaattc

2162

Beispiel 1

Herstellung der Promotersequenz gemäß SEQ ID No. 1

Die Amplifikation der fünf verschiedenen genomischen DNA-Bereiche, die Promoterbereich des humanen μ -Opioid-Rezeptors abdecken, erfolgte mit Hilfe des PromoterFinder DNA Walking Kits von Clontech.

Der Kit besteht aus fünf unterschiedlichen Genbanken, die zuvor mit jeweils einer der spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten und an deren Enden Adaptoren ligiert wurden. Für die Erst-PCR wurden der spezifische 'Adapter-Primer' (AP1) mit der Sequenz 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' und der genspezifische Primer (GSP1) MOR1X-R229G mit der Sequenz 5'-GCAATTGCTGGCGTTCGTGGGGG-3' bzw. MOR1X-R330T mit der Sequenz 5'-CGGTTCGGACCGCATGGGTTCGGACAGGTT-3' eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 10xTth PCR-Puffer (400 mM Tris-HCl, 150 mM KOAc, pH 9,3), 10 mM dNTPs, 25 mM Mg(OAc)₂, 10 μ M AP1, 10 μ M GSP1, Advantage Tth Polymerase (5 U) sowie jeweils eine EcoRV-, ScaI-, DraI-, PvuII- oder SspI-Genbank.

Die Erst-PCR wurde in einem Perkin Elmer Thermocycler 9600 wie folgt durchgeführt:

7 Zyklen: 94 °C für 2 sec, 72 °C für 3 min; 32 Zyklen: 94 °C für 2 sec, 67 °C für 3 min, abschließend 67 °C für 4 min. Die

Erst-PCR wurde 1:50 mit dest. H₂O verdünnt.

Für die Zweit-PCR wurden der 'nested' 'Adapter-Primer' (AP2) mit der Sequenz 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' und der 'nested' genspezifische Primer (GSP2) MOR1X-P1 mit der Sequenz 5'-GACCGAGCTGAGCATCTGACATTC-3' bzw. MOR1X-R229G mit der Sequenz 5'-GCAATTGCTGGCGTTCGTGGGGG-3' eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 10xTth PCR-Puffer (400 mM Tris-HCl, 150 mM KOAc, pH 9,3), 10 mM dNTPs, 25 mM Mg(OAc)₂, 10 µM AP2, 10 µM GSP2, Advantage Tth Polymerase (5 U) sowie die fünf verdünnten Genbanken.

Die Zweit-PCR wurde in einem Perkin Elmer Thermocycler 9600 wie folgt durchgeführt: 5 Zyklen: 94 °C für 2 sec, 72 °C für 3 min; 20 Zyklen: 94 °C für 2 sec, 67 °C für 3 min, abschließend 67 °C für 4 min. Die fünf verschiedenen Fragmente wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmente hatten eine Größe von ca. 2,8 kb unter Verwendung der ScaI-Genbank, ca. 2,6 kb unter Verwendung der DraII-Genbank, ca. 1,6 kb unter Verwendung der SspI-Genbank, ca. 1,5 kb unter Verwendung der PvuII-Genbank und ca. 1,2 kb unter Verwendung der EcoRV-Genbank. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des ThermoSequenase 'cycle sequencing kits' von Amersham. Als Sequenzierprimer wurden die Zweit-PCR-Primer verwendet sowie sukzessiv neue Primer synthetisiert. Mittels der gleichen Strategie wurden die genomischen DNA-Sequenzen an den 5'- und 3'-Bereichen des Introns 1 gemäß SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4 sowie des Introns 3 gemäß SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 6 kloniert.

Beispiel 2

Mittels einer analogen Strategie wurde die genomische DNA-Sequenz des Introns 2 gemäß SEQ ID No. 2 kloniert.

Patentansprüche

1. Genomische Sequenz des menschlichen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie seine Varianten, Polymorphismen und Mutanten.

2. Genomische Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß sie eine Basenfolge gemäß SEQ ID No 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 5, No. 6 und No. 7 aufweist.

3. Genomische Sequenz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfolgen an bis zu 100, bevorzugt bis zu 37 Positionen in den Sequenzen gemäß SEQ ID No. 1 bis No. 7 ausgetauscht sind.

4. Genomische Sequenz nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfolge an folgenden Positionen ausgetauscht ist:

Name	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch/ Splice-Variante	Region
------	--------------------	---	--------

-1793/4T→A	T→A bei -1793/4		RG
-1768ins22	Insertion von 22 bp nach -1768		RG
-1699insT	Insertion von T nach -1699		RG
-1595T→C	T→C bei -1595		RG
-1565T→C	T→C bei -1565		RG
-1469T→C	T→C bei -1469		RG
-1320A→G	A→G bei -1320		RG
-1255A→T	A→T bei -1255		RG
-1236A→G	A→G bei -1236		RG
-1171A→G	A→G bei -1171		RG
-1045A→G	A→G bei -1045		RG

-995C→A	C→A bei -995	RG
-692G→C	G→C bei -692	RG
-665del3	Deletion von 3 bp von -665 bis -663	RG
-554G→A	G→A bei -554	RG
-488G→T	G→T bei -488	RG
-254A→C	A→C bei -254	RG
-236A→G	A→G bei -236	RG
IVS2+31G→A	G→A bei 643 + 31 Putative Splice-Variante	Intron 2
IVS2+106T→C	T→C bei 643 + 106	Intron 2
IVS2+397T→A	T→A bei 643 + 397	Intron 2
IVS2+438G→A	G→A bei 643 + 438	Intron 2
IVS2+480T→C	T→C bei 643 + 480	Intron 2
IVS2+534C→T	C→T bei 643 + 534	Intron 2
IVS2+691G→C	G→C bei 643 + 691	Intron 2
IVS3+37A→C	A→C bei 1164 + 37	Intron 3

5. Promoter-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Basenpaare 1 - 2412 gemäß SEQ ID No. 1 aufweist.

6. cDNA-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die SEQ ID No. 7 aufweist.

7. cDNA-Region der genomischen Sequenz gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfolge an bis zu 50, bevorzugt bis zu 20 Positionen, besonders bevorzugt bis zu 11 Positionen, in der Sequenz 1 - 2162 ausgetauscht ist.

8. cDNA-Region der genomischen Sequenz gemäß Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfolge an folgenden

Positionen ausgetauscht ist:

Name	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch/ Splice-Variante	Region	cDNA Position
-172G→T	G→T bei -172		Exon 1	41
-133C→T	C→T bei -133		Exon 1	80
-111C→T	C→T bei -111		Exon 1	102
-38C→A	C→A bei -38		Exon 1	175
A6V(C→T)	C→T bei 17	Ala→Val bei 6	Exon 1	229
N40D(A→G)	A→G bei 118	Asn→Asp bei 40	Exon 1	330
N152D(A→G)	A→G bei 454	Asn→Asp bei 152	Exon 2	666
R265H(G→A)	G→A bei 794	Arg→His bei 265	Exon 3	1006
S268P(T→C)	T→C bei 802	Ser→Pro bei 268	Exon 3	1014
T314T(G→A)	G→A bei 942	Thr=Thr bei 314	Exon 3	1154
1401G→C	G→C bei 1401		Exon 4	1613

9. Intron 2-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie 773 Basenpaare gemäß der SEQ ID No. 2 aufweist, die sie sich zwischen der 855. und 856. Nukleotidposition der cDNA-Sequenz (bzw. zwischen der Position 643 und 644 relativ zum A des Translationsstartpunkts) befindet.

10. Intron 1 5'-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie 383 Basenpaare gemäß der SEQ ID No. 3 aufweist, die sich nach der Nukleotidposition 502 der cDNA-Sequenz (bzw. nach der Position 290 relativ zum Translationsstartpunkt) befindet.

11. Intron 1 3'-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet, daß sie 538 Basenpaare gemäß der SEQ ID No. 4 aufweist, die sich vor der Nukleotidposition 503 der cDNA-Sequenz (bzw. vor der Position 291 relativ zum Translationsstartpunkt) befindet.
12. Intron 3 5'-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet, daß sie 300 Basenpaare gemäß der SEQ ID No. 5 aufweist, die sich nach der Nukleotidposition 1376 der cDNA-Sequenz (bzw. nach der Position 1164 relativ zum Translationsstartpunkt) befindet.
13. Intron 1 3'-Region der genomischen Sequenz nach Anspruch 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet, daß sie 400 Basenpaare gemäß der SEQ ID No. 6 aufweist, die sich vor der Nukleotidposition 1377 der cDNA-Sequenz (bzw. vor der Position 1165 relativ zum Translationsstartpunkt) befindet.
14. Verwendung der Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Entwicklung von Therapeutika.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Entwicklung von Analgetika/Anästhetika und Drogen-Therapeutika sowie Psychopharmaka im weiteren Sinne.
16. Verwendung der Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum Aufbau von Genen bzw. von Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen.
17. Verwendung der Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage des Suchtrisikos, wie z.B. auf Opiate und andere suchterzeugende

Substanzen.

18. Verwendung der Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene Analgetika und/oder Anästhetika.

19. Verwendung der Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der individuellen unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen.

20. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, insbesondere Suchterkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und an den ausgewählten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen werden.

21. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen -1793/4T->A, -1768ins22, -1699insT, -1469T->C und -1320A->G genotypisiert werden.

22. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 3 der 5 Positionen genotypisiert werden.

23. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß alle 5 Positionen genotypisiert werden.

24. Verfahren nach Anspruch 20,

dadurch gekennzeichnet, daß die Genotypisierung durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind, erfolgt.

25. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung einer Disposition für familiär bedingten Alkoholismus die Position 330 der cDNA-Sequenz genotypisiert wird.

26. Verfahren nach Anspruch 20 zur Bestimmung einer Disposition für Kokainsucht.

27. Verfahren nach Anspruch 20 zur Bestimmung einer Opiatabhängigkeit.

Varianten des menschlichen μ Opioid Rezeptor Genes

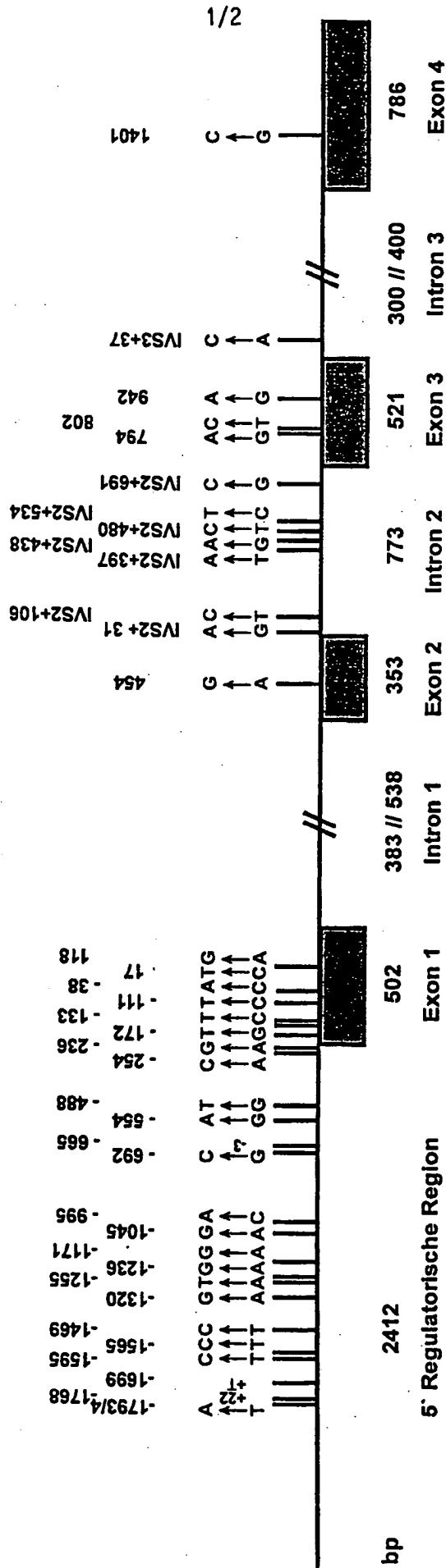


Abbildung 1a

2/2

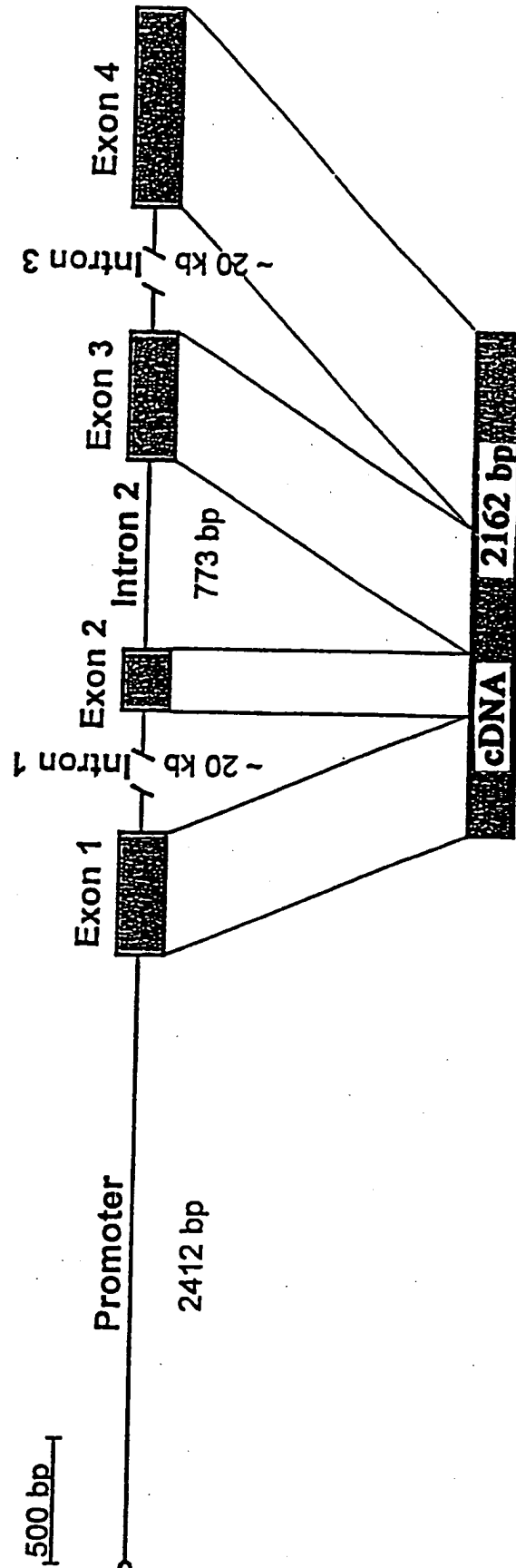
Organisation des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes

Abbildung 1b



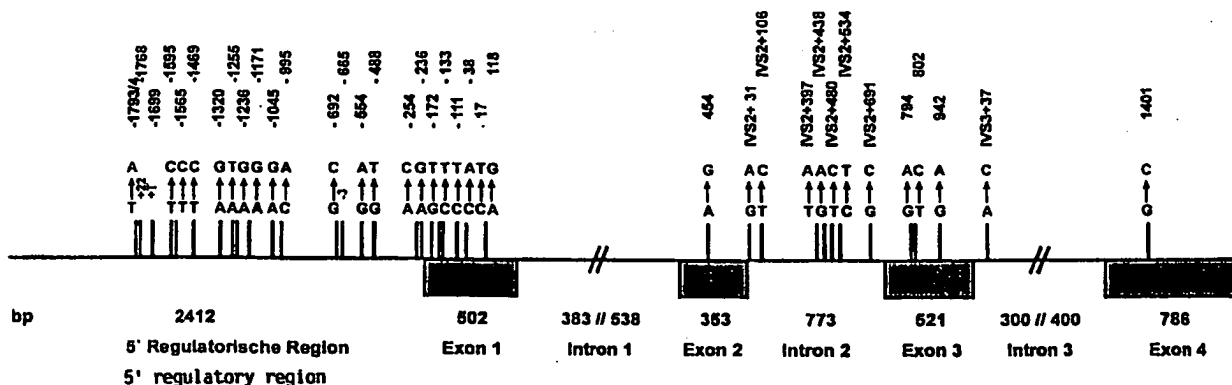
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/705, C12N 15/12, A61K 38/17</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/33937</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. August 1998 (06.08.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/00382</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Februar 1998 (02.02.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 03 925.1 3. Februar 1997 (03.02.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOEHE, Margret [DE/DE]; Bartningallee 7, D-10557 Berlin (DE). WENDEL, Birgit [DE/DE]; Feuerbachstrasse 53, D-12163 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 17. September 1998 (17.09.98)</p>	

(54) Title: **GENOMIC SEQUENCE OF THE HUMAN μ -OPIOID RECEPTOR GENE AND THE VARIANTS, POLYMORPHISMS AND MUTATIONS THEREOF**

(54) Bezeichnung: **GENOMISCHE SEQUENZ DES HUMANEN μ -OPIOID-REZEPTOR GENES SOWIE SEINER VARIANTEN, POLYMORPHISMEN UND MUTATIONEN**

Varianten des menschlichen μ Opioid Rezeptor Genes

VARIATIONS OF THE HUMAN μ OPIOID RECEPTOR GENE



(57) Abstract

The invention relates to the genomic sequence of the human μ -opioid receptor gene and the variants, polymorphisms and mutations thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die genomische Sequenz des humanen μ -Opioid-Rezeptor Genes sowie seiner Varianten, Polymorphismen und Mutationen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/00382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/705 C12N15/12 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG J-B. ET AL.: "Human mu opiate receptor" FEBS LETTERS. vol. 338, - 1994 pages 217-222. XP002070827 see the whole document, in particular introduction and discussion, gene bank No.125119	1-3. 14-20
X	WO 95 07983 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23 March 1995 see in particular claims ---	14-20
X	WO 95 20667 A (US HEALTH) 3 August 1995 see in particular claims 15 and next and page 2, line 9 and next --- -/--	14-20



Further documents are listed in the continuation of box C



Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 1998

Date of mailing of the international search report

23/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/DE 98/00382

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X.P	BERGEN AW. ER AL.,: "mu opioid receptoe gene variants: lack of association with alcohol dependence" MOLECULAR PSYCHIATRY, vol. 2. - 1997 pages 490-494. XP002070828 see in particular abstract and fig. 1 and tables 1 and 2	1-4,8, 20.25
A	----- BARE L. A. ET AL.,: "Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain" FEBS LETTERS, vol. 354, - 1994 pages 213-216. XP002070826 see the whole document, in particular introduction	1-4,12
T	----- WEDEL B.& HOEHE M. : "The human mu opioid receptor gene: 5'regulatory and intronic sequences" J. MOL. MED. vol. 76, no. 7. - June 1998 pages 525-532. XP002070825 see the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/00382

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9507983	A	23-03-1995	CA 2171739 A	23-03-1995
			EP 0797661 A	01-10-1997
			JP 9506241 T	24-06-1997
WO 9520667	A	03-08-1995	AU 1694195 A	15-08-1995

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K14/705 C12N15/12 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WANG J-B. ET AL.,: "Human mu opiate receptor" FEBS LETTERS, Bd. 338, - 1994 Seiten 217-222, XP002070827 siehe das ganze Dokument, besonders Einleitung und Diskussion, genbank #L25119 ---	1-3, 14-20
X	WO 95 07983 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23.März 1995 siehe besonders Ansprüche ---	14-20
X	WO 95 20667 A (US HEALTH) 3.August 1995 siehe besonders Ansprüche 15 ff und Seite 2. Zeile 9 ff --- -/-	14-20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Juli 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/07/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	BERGEN AW. ER AL.,: "mu opioid receptoe gene variants: lack of association with alcohol dependence". MOLECULAR PSYCHIATRY, Bd. 2, - 1997 Seiten 490-494, XP002070828 siehe besonders Zusammenfassung und Abbildung 1 und Tabellen 1 und 2 ---	1-4,8, 20,25
A	BARE L. A. ET AL.,: "Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain" FEBS LETTERS, Bd. 354, - 1994 Seiten 213-216, XP002070826 siehe das ganze Dokument, besonders Einleitung ---	1-4,12
T	WEDEL B.& HOEHE M. : "The human mu opioid receptor gene: 5'regulatory and intronic sequences" J. MOL. MED, Bd. 76, Nr. 7, - Juni 1998 Seiten 525-532, XP002070825 siehe das ganze Dokument -----	1-27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9507983 A	23-03-1995	CA 2171739 A EP 0797661 A JP 9506241 T	23-03-1995 01-10-1997 24-06-1997
WO 9520667 A	03-08-1995	AU 1694195 A	15-08-1995